

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04668

研究課題名(和文) 遺伝性鉄芽球性貧血の病態解明、新規治療法の開発に向けた国際共同研究

研究課題名(英文) International collaborative effort to study of pathophysiology and development of novel therapy of congenital sideroblastic anemia

研究代表者

張替 秀郎 (Harigae, Hideo)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50302146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：天津血液医院から17名の遺伝性鉄芽球性貧血症例の情報を得た。このうち7例にALAS2遺伝子の変異が、3例にSLC25A38遺伝子の変異が認められた。中国の復旦大学、湛江中心人民医院においては新規症例の同定には至らなかった。インドのNational Institute of Immunohaematologyにおける先天性貧血22症例の解析を行ったが、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子の変異は認められなかった。本邦においては新たにHSPA9遺伝子、SLC5A6遺伝子の変異が見いだされた。この変異については、in vitro鉄芽球作成モデル系で疾患責任変異であるかどうか検証中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性鉄芽球性貧血はミトコンドリアにおける鉄代謝に異常が生じ発症する難治性貧血である。極めてまれな疾患で、新たな治療法の開発には国際間での症例の蓄積が必要である。本研究によって、中国・インドにおいても症例数が限られていることが明らかとなった。一方で、中国で確認された症例の遺伝子変異は日本でのそれと類似していることが確認できた。また、本邦においても新たな候補遺伝子が確認され、本研究で確立したin vitroのモデル系で検証中である。本研究で国際的な共同研究体制が確立できたこと、またin vitroでのモデル系が確立できたことは極めて学術的・社会的に意義があると思われる。

研究成果の概要(英文)：As congenital sideroblastic anemia (CSA) is very rare, there is a need to collect the data of patients and clarify the molecular pathogenesis to develop a novel therapy by the international collaborative study. In this study, 17 cases of congenital sideroblastic anemia were found at Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College. In 7 out of 17 cases, mutations of 5-aminolevulinate synthase (ALAS2) gene, which is the first enzyme of heme biosynthesis in erythroid cells were identified. In addition, mutations of SLC25A38 gene, which codes the mitochondrial glycine transporter were identified in 3 out of 17 cases. Gene mutations of 22 congenital anemia cases at National Institute of Immunohaematology in India were analyzed; however, mutations responsible for CSA were not identified. In Japan, a novel mutation of HSPA9 gene and SLC5A6 gene was found. The significance of mutations are being confirmed by in vitro differentiation system established in this study.

研究分野：血液内科学

キーワード：鉄芽球性貧血

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鉄芽球性貧血は、骨髄における環状鉄芽球の出現を特徴とする貧血であり、環状鉄芽球はミトコンドリアへの鉄の異常蓄積により形成される。鉄芽球性貧血は、遺伝性鉄芽球性貧血と、骨髄異形成症候群(MDS)およびアルコールや薬剤による二次性鉄芽球性貧血からなる後天性鉄芽球性貧血に大別される。遺伝性鉄芽球性貧血はまれな疾患で、ヘム合成や鉄-硫黄クラスター形成にかかわる遺伝子などの変異により、ミトコンドリアにおける鉄代謝に異常が生じ発症する難治性貧血である。遺伝性鉄芽球性貧血のうち最も解析が進んでいる鉄芽球性貧血は、赤血球におけるヘム合成系の初発酵素である赤血球型 5-アミノレブリン酸合成酵素(ALAS2)の変異による X 連鎖性鉄芽球性貧血(XLSA)であり、ミトコンドリアにおけるポルフィリン環の合成障害による鉄の利用不全がその原因と考えられている(Harigae et al. *Blood* 1998, 2003, *EMBO J* 1999, *Hematologica* 2014)。

これまでに申請者らは、本邦における遺伝性鉄芽球性貧血に関する全国規模の多施設共同後方視的研究を行い、診断分類を確立した(Ohba et al. *Ann Hematol* 2013)。この調査研究で登録された遺伝性鉄芽球性貧血症例のうち 67%で ALAS2 の異常を認めた。米国においても、その原因遺伝子の多くが本邦と同様に ALAS2(37%)であるものの、SLC25A38 の変異(15%)も少なからず見出されており、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子には人種差・地域差がある可能性が示唆されるが、本疾患が希少疾患であることからその実態は不明である。さらに、それぞれの調査研究において、既知の原因遺伝子の変異が認められない症例が少なからず認められることから、未知の本疾患の原因遺伝子が存在することが強く示唆される。遺伝性鉄芽球性貧血に対する治療については、XLSA 以外の遺伝性鉄芽球性貧血については確立されたものはない。従って、重症例においては、赤血球輸血や鉄キレート療法等の対症療法のみが行われている。根治療法として同種造血幹細胞移植があるものの、この治療自体が非常に高いリスクを伴うため、その適応は極めて限定される。

遺伝性鉄芽球性貧血に対する臨床上的課題であるこれらの分子疫学調査および新規治療法の開発を進めるためには症例の蓄積が必要であるが、遺伝性鉄芽球性貧血は希少疾患であるため、本邦のみの研究では限界があり国際的共同研究が必須である。そこで本研究では、日・中・印 3 か国の共同研究により症例を収集し、申請者らのグループが行った鉄芽球性貧血に関する大規模疫学調査の経験及びこれまでに蓄積してきた研究試料、予備的知見と技術を基盤として、本疾患の病態および遺伝子解析を行うこととした。

2. 研究の目的

遺伝性鉄芽球性貧血の分子疫学を明らかにすること、新規原因遺伝子を同定すること、後天性鉄芽球性貧血との赤芽球形質相違を明らかにすること、最終的に治療標的分子を同定し新規治療法を開発することが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

中国の小児診療センター施設である中国医学科学院・血液学研究所・血液病医院(天津血液医院)、復旦大学およびインドの National Institute Of Immunohematology (Indian Council of Medical Research)と連携し症例を蓄積する。また、米国の本疾患登録センターであるハーバード大学と情報を共有する。

まず、一次スクリーニングとして各共同研究施設で遺伝性鉄芽球性貧血が疑われる症例を収集し、その血液学・生化学検査、年齢、性別をデータベース化する。

次に、確定診断のために、中国では自施設にて、これまで同定されている遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子のターゲットシーケンスを行い、既知の遺伝子に変異が認

められなかった症例については全エクソン解析を行う。インドの症例については解析基盤が確立されていないことから、日本に検体を送付し申請者の施設において遺伝子解析を行う。

新たな遺伝子変異が認められた場合は、東北大学において *in vitro*、*in vivo* 解析を行い、鉄芽球性貧血の原因遺伝子であることを確認する。

さらに東北大学にて収集した後天性鉄芽球性貧血由来の鉄芽球と各施設で収集した遺伝性鉄芽球性貧血由来の鉄芽球の形質の差をトランスクリプトーム解析などで明らかにする。

4. 研究成果

共同研究先の天津血液医院から 17 名の遺伝性鉄芽球性貧血症例の情報を得た。このうち 7 例に赤血球のヘム合成の律速酵素である *ALAS2* 遺伝子の変異が認められており、その他 3 例でグリシンの取り込みタンパク質である *SLC25A38* 遺伝子の変異が認められていた日本と中国での遺伝的背景の違いが示唆される。さらに共同研究先として、中国の蘇州大学、湛江中心人民医院を追加することができたが、これらの施設においては新規症例の同定には至らなかった。最終年度後半に再度これらの共同研究施設を訪問することを計画していたが、コロナウイルスの影響により渡航を断念せざるを得ず研究の進展を図ることができなかつたのが残念である。

インドの National Institute of Immunohaematology から、診断未確定の先天性貧血 22 症例の末梢血検体を得て解析を行ったが、遺伝性鉄芽球性貧血の原因となり得る遺伝子の変異は認められなかった。しかしながら、これらの解析結果を論文化することができている(Kedar PS et al. Int J Hematol 2019)。

また、本邦での本疾患の収集・解析を進めた結果、新たに *HSPA9* 遺伝子の変異が同定された。この変異については後述のモデル系を用いて検証中である。また、*SLC5A6* 遺伝子の変異も新たに見いだされた。この変異については米国のレジストリーにおいても登録されており、現在ハーバード大学と形質の類似性について検証中である。

同定された変異が疾患の原因であることを証明するためには、モデルの確立が必要であるが、ヒト iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来赤芽球細胞株(HiDep)、ヒトさい帯血由来赤芽球細胞株(HuDep)を用いた *In vitro* 分化系で鉄芽球を作成するモデル系を確立することができた。具体的には、XLSA 症例の間葉系幹細胞から iPS 細胞を樹立し、ストローマ細胞株である OP9 細胞と共培養し、オリジナルな培養条件により *In vitro* 分化系で鉄芽球を作成する系を確立した。さらに、HiDep および HuDep 細胞に CRISPER/CAS9 システムを用いて、XLSA で同定された *ALAS2* 遺伝子の変異を導入し、ヒト iPS 細胞からの鉄芽球分化系と同様の培養条件を用いて *In vitro* 分化系で鉄芽球を作成する系を確立した(HattaS, et al, Haematologica 2018, Saito K et al, Mol Cell Biol 2019)。この系を用いて、新たに同定された遺伝子変異が疾患発症変異かどうか現在検証中である。

また、遺伝性鉄芽球性貧血と後天性鉄芽球性貧血の形質の差異については、遺伝性鉄芽球性貧血の鉄芽球と骨髄異形成症候群の鉄芽球との間で発現遺伝子を確認したところ、遺伝性鉄芽球性貧血の鉄芽球で 2 倍以上の発現量を示した遺伝子は 18% (4417 遺伝子)、骨髄異形成症候群の鉄芽球で 2 倍以上の発現量を示した遺伝子は 21% (5234 遺伝子)、2 倍以内の発現変化であった遺伝子は 69% (14811 遺伝子) であり、比較的

遺伝子プロフィールが近似していることが示唆された。

政策提言等

先天性骨髄不全症診療ガイドライン 2017

難治性貧血の診療ガイド 2020（刊行予定）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishida H, Imamura T, Morimoto A, Fujiwara T, Harigae H.	4. 巻 60
2. 論文標題 Five-aminolevulinic acid: New approach for congenital sideroblastic anemia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatr Int.	6. 最初と最後の頁 496-497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.13558.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawakami T, Nakazawa H, Kawakami F, Matsuzawa S, Sudo Y, Sakai H, Nishina S, Senoo N, Senoo Y, Komatsu M, Umemura T, Yamaguchi T, Kosho T, Fujiwara T, Harigae H, Ishida F.	4. 巻 59
2. 論文標題 Successful treatment of X-linked sideroblastic anemia with ALAS2 R452H mutation using vitamin B6	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki.	6. 最初と最後の頁 401-406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.59.401.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Saito K, Kamata M, Tamai Y, Kawamata S, Harigae H.	4. 巻 103
2. 論文標題 A defined culture method enabling the establishment of ring sideroblasts from induced pluripotent cells of X-linked sideroblastic anemia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Haematologica.	6. 最初と最後の頁 188-191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2017.179770.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujiwara T, Harigae H.	4. 巻 133
2. 論文標題 Molecular pathophysiology and genetic mutations in congenital sideroblastic anemia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radic Biol Med.	6. 最初と最後の頁 179-185.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara T, Fukuhara N, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Onishi Y, Furuyama K, Harigae H.	4. 巻 96
2. 論文標題 A novel heterozygous ALAS2 mutation in a female with macrocytic sideroblastic anemia resembling myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts: a case report and literature review.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Ann Hematol.	6. 最初と最後の頁 1955-1957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-017-3106-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kedar PS, Harigae H, Ito E, Muramatsu H, Kojima S, Okuno Y, Fujiwara T, Dongerdiye R, Warang PP, Madkaikar MR.	4. 巻 60
2. 論文標題 Study of pathophysiology and molecular characterization of congenital anemia in India using targeted next-generation sequencing approach.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 408-416.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00387-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Saito K, Tohru Fujiwara T, Ota U, Hatta T, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Noriko Fukuhara N, Onishi Y, Ishizuka M, Tanaka T, Harigae H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Dynamics of absorption, metabolism, and excretion of 5-aminolevulinic acid in human intestinal Caco-2 cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep	6. 最初と最後の頁 105-111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2017.07.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito K, Fujiwara T, Hatta S, Morita M, Ono K, Suzuki C, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Kawamata S, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H.	4. 巻 19
2. 論文標題 Generation and Molecular Characterization of Human Ring Sideroblasts: a Key Role of Ferrous Iron in Terminal Erythroid Differentiation and Ring Sideroblast Formation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 e00387-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00387-18.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 藤原亨、張替秀郎
2. 発表標題 先天性鉄芽球性貧血の原因遺伝子に関する疫学調査.
3. 学会等名 第37回日本染色体遺伝子検査学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原亨、斎藤慧、張替秀郎
2. 発表標題 Ring sideroblast and iron metabolism
3. 学会等名 第81回日本血液学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujiwara T, Saito K, Suzuki C, Ono K, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Harigae H.
2. 発表標題 Epidemiology and molecular characterization of congenital sideroblastic anemia.
3. 学会等名 The 8th International Bioiron Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujiwara T, Suzuki C, Ochi T, Ono K, Saito K, Fukuhara N, Onishi Y, Hisayuki Y, Fujimaki S, Nakamura Y, Harigae H.
2. 発表標題 Characterization of congenital sideroblastic anemia model due to ABCB7 defects: How do defects in iron-sulfur cluster metabolism lead to ring sideroblast formation?
3. 学会等名 The 61th ASH Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ono K, Fujiwara T, Saito K, Suzuki C, Takahashi N, Onodera K, Ichikawa S, Fukuhara N, Onishi Y, Hisayuki Y, Nakamura Y, Harigae H.
2. 発表標題 Molecular Characterization and Novel Therapeutic Strategy for X-linked Sideroblastic Anemia Associated with ALAS2 Missense Variants.
3. 学会等名 The 61th ASH Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki C, Fujiwara T, Shima H, Saito K, Ono K, Fukuhara N, Onishi Y, Hisayuki Y, Fujimaki S, Nakamura Y, Harigae H.
2. 発表標題 Proteomic analysis of mitochondrial membrane protein FAM210B in erythroid cells.
3. 学会等名 The 61th ASH Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 斎藤慧、藤原亨、八田俊介、福原規子、大西康、中村幸夫、田中徹、張替秀郎
2. 発表標題 X連鎖性鉄芽球性貧血モデルの樹立および特性解析
3. 学会等名 第42回日本鉄バイオサイエンス学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原亨、八田俊介、斎藤慧、福原規子、大西康、田中徹、川真田伸、張替秀郎
2. 発表標題 X連鎖性鉄芽球性貧血患者の疾患特異的iPS細胞の樹立
3. 学会等名 第42回日本鉄バイオサイエンス学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 張替秀郎
2. 発表標題 鉄代謝と貧血
3. 学会等名 第115回日本内科学会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saito K, Fujiwara T, Hatta S, Onodera K, Ichikawa S, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Harigae H
2. 発表標題 Characterization of in vitro model of X-linked sideroblastic anemia
3. 学会等名 第80回日本血液学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saito K, Fujiwara T, Hatta S, Suzuki C, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Harigae H
2. 発表標題 Generation and Molecular Characterization of Human Ring Sideroblasts
3. 学会等名 60th ASH Annual Meeting & Exposition(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Saito K, Kamata M, Tamai Y, Kawamata S, Harigae H
2. 発表標題 Generation of induced pluripotent stem cell-derived erythroblasts of X-linked sideroblastic anemia
3. 学会等名 第79回日本血液学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Saito K, Fujiwara T, Morita M, Hatta S, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura n, Shimizu R, Harigae H
2. 発表標題 Establishment of in vivo and in vitro model of x-linked sideroblastic anemia by CRISPER/Cas9
3. 学会等名 第79回日本血液学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ishida H, Fujiki A, Imamura T, Morimoto A, Ota U, Takahashi K, Ishizawa M, Fujiwara T, Harigae H
2. 発表標題 A novel therapeutic approach for congenital sideroblastic anemia using 5-aminolevulinic acid.
3. 学会等名 第79回日本血液学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤原亨、福原規子、猪俣美津恵、大西康、古山和道、張替秀郎
2. 発表標題 ALAS2遺伝子変異を認めた大球性鉄芽球性貧血の一例
3. 学会等名 第41回日本鉄バイオサイエンス学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 張替秀郎
2. 発表標題 鉄と赤血球造血
3. 学会等名 第28回日本微量元素学会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 張替秀郎
2. 発表標題 鉄芽球性貧血の病態
3. 学会等名 第12回臨床ストレス応答学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Saito K, Fujiwara T, Morita M, Hatta S, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Shimizu R, Harigae H
2. 発表標題 Establishment of in vivo and in vitro model of X-linked sideroblastic anemia
3. 学会等名 22nd Congress of European Hematology Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Saito K, Fujiwara T, Hatta S, Oktsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Harigae H
2. 発表標題 Establishment of in vitro model of X-linked sideroblastic anemia
3. 学会等名 59th ASH Annual Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	梨井 康 (Rii Ko) (60321890)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・移植免疫研究室・室長 (82612)	